Journal of Water and Soil
https://jsw.um.ac.ir

Research Article
Vol. 38, No. 1, Mar.-Apr. 2024, p. 87-104

The Effect of *Funneliformis mosseae* Fungus and *Acidithiobacillus* Application on Some Biochemical Metabolites of Maize (*Zea mays* L.) Exposed to Salinity Stress

J. Al-Jomah[1], A. Halajnia[2]*, A. Lakzian[3], A.R. Astaraei[2]

1, 2 and 3- Former Ph.D. Student, Associate Professor and Professor, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran, respectively.
(*- Corresponding Author Email: halajnia@um.ac.ir)

Received: 30-09-2023
Revised: 13-11-2023
Accepted: 14-11-2023
Available Online: 15-11-2023

How to cite this article:
Al-Jomah, J., Halajnia, A., Lakzian, A., & Astaraei, A.R. (2024). The effect of *Funneliformis mosseae* fungus and *Acidithiobacillus* application on some biochemical metabolites of maize (*Zea mays* L.) exposed to salinity stress. *Journal of Water and Soil, 38*(1), 87-104. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/jsw.2023.84667.1339

Introduction

Saline soils resulting from natural and/or anthropogenic processes are very diverse and widely distributed under all climates. Soil salinity as a serious environmental problem has negative effects on plant growth and development in arid and semi-arid as well as humid regions. Since increasing global food security is a fundamental goal to feed the growing world population, it is necessary to develop suitable and efficient techniques for the rehabilitation of salt-affected soils and their exploitation. Chemical fertilizers are usually used to provide nutrients required for plant growth in order to increase crop yield, but application of these chemical components has negative environmental effects and reduces the quality of soils and agricultural products. The use of beneficial microorganisms (bacteria and fungi) as fertilizers and biological amendments has a high potential to improve productivity in saline soils. The aim of this study was to investigate the effect of using *Acidithiobacillus* bacteria along with mycorrhiza on the production of some photosynthetic and biochemical metabolites in maize under salt stress and comparing it with control conditions.

Materials and Methods

To perform this experiment, a surface soil sample was collected from a depth of 30 cm from the campus of Ferdowsi University of Mashhad, and some physical and chemical properties of the soil were measured by usual laboratory methods. To prepare saline soil a mixture of four compounds $MgSO_4.7H_2O$, Na_2SO_4, NaCl, and $CaCl_2.2H_2O$ were used. The mycorrhizal fungus (*Funneliformis mosseae)* and mesophilic *Acidithiobacillus* bacteria species two types of bacteria, *Acidithiobacillus thiooxidans* PTCC No: 1692 (DSM 504) and *Acidithiobacillus ferrooxidans* PTCC No: 1646 (DSM 583), were purchased from Turan Biotechnology Company (Semnan Science and Technology Park) and Iran Microbial Scientific and Industrial Research Center (PTCC), respectively. In this research, the effect of biological treatments including: two levels of mycorrhiza (inoculation and non-inoculation), two levels of salinity (0.96 and 6 d/m) and four levels of *Acidithiobacillus* control (C), *Acidithiobacillus thiooxidans* (T), *Acidithiobacillus Ferrooxidans* (F), *Acidithiobacillus thiooxidans and Ferrooxidans* (T+F) were compared with each other on some photosynthetic and biochemical characteristics of *Zea mays* under greenhouse conditions in the form of a completely



https://doi.org/10.22067/jsw.2023.84667.1339

randomized design with factorial arrangement with three replications. 10 gr of salt mixture (this amount of salt was obtained to reach electrical conductivity of 6 in the pre-experiment) was added to 5 kg of soil and the soil moisture of the pots was kept for one month in the field capacity. Bacterial treatments were inoculated with 30 mL of cell suspension per pot (approximately 10^7 CFU mL^{-1}). In the simultaneous use of two bacteria, 15 ml of each bacterial cell suspension (15+15) was added to each pot. Single-cross 704 variety of maize was grown in pots and soil moisture was maintained during the growth period in the field capacity by weighing. Chlorophyll a, b and carotenoid, concentrations of flavonoids, anthocyanins and proline and electrical leakage were measured in fresh leaf samples (third leaf on the stem).

Results and Discussion

The results showed that salinity decreased the percentage of root colonization and chlorophyll a and b content in leaves. Salinity decreased chlorophyll a, b and carotenoid in leaves by 27.9, 68.42% and 50%, respectively. Salinity increased proline concentration (42.62%), electrolyte leakage (33.30%), anthocyanins concentration (96.36%) and leaf flavonoids (84.73%) compared to control soil. Inoculation with mycorrhiza compared to no inoculation had a remarkable and significant effect on all investigated parameters in both saline and control soils. In saline soil, mycorrhizal inoculation reduces electrolyte leakage (56.75%) and increases chlorophyll a (2.3 times), chlorophyll b (6.6 times), carotenoid (1.3 times), proline concentration (24.39%), anthocyanins amount (24.07) and flavonoids (20.4%) in the plant. The effect of bacterial treatments on the investigated parameters in plants inoculated with mycorrhiza was greater than non-inoculated treatments. The effectiveness of the simultaneous application of both bacteria was greater than the effect of each of them alone. In saline soil, simultaneous inoculation of mycorrhizae with both bacteria species reduces electrolyte leakage (14.72%) and increases chlorophyll a (39.80%), chlorophyll b (106%), carotenoid (50%), proline concentration (10.12%), the amount of anthocyanins (14.17%) and flavonoids (4.06%) compared to mycorrhiza treatment alone. The results showed that these bacteria can probably be considered as helping mycorrhizal bacteria.

Conclusion

The objective of this study was to examine the impact of simultaneous inoculation of mycorrhizae and Acidithiobacillus bacteria on select photosynthetic and biochemical metabolites of maize subjected to salinity stress conditions. Confirming the results of other studies, the results of this research also showed the clear and distinct effect of mycorrhiza on increasing chlorophyll and producing metabolites effective in increasing plant resistance to salt stress. In addition, the results showed that although the use of each species of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans* alone was effective on the measured parameters in both saline and control soils, the simultaneous inoculation of both *Acidithiobacillus* bacteria species and mycorrhiza had the greatest effect on increasing chlorophyll, production of proline, anthocyanins and flavinoids and reducing electrolyte leakage and as a result, increasing tolerance to salt stress. In other words, these bacteria can be considered as mycorrhiza helper bacteria, whose activity can improve the function of mycorrhiza. On the other hand, mycorrhiza symbiosis may have increased the efficiency of these bacteria by changing the soil conditions and the environment around the roots. However, further greenhouse and field experiments with other plant species are necessary to confirm these findings.

Keywords: Biofertilizer, Mycorrhizal helping bacteria, Mycorrhizal symbiosis, Proline, Salt affected soils

نشریه آب و خاک
https://jsw.um.ac.ir

مقاله پژوهشی
جلد ۳۸، شماره ۱، فروردین-اردیبهشت ۱۴۰۳، ص. ۱۰۴-۸۵

تأثیر قارچ *فانلی فورمیس موسه* و *اسیدی تیوباسیلوس* بر برخی متابولیت‌های بیوشیمیایی ذرت (*Zea mays* L.) تحت تنش شوری

جمعه الجمعه[1]- اکرم حلاج نیا[2]*- امیر لکزیان[3]- علیرضا آستارایی[2]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۷/۰۸
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۸/۲۳

چکیده

دستیابی به امنیت غذایی یک هدف بسیار ضروری برای تغذیه جمعیت رو به رشد جهان است، توسعه تکنیک‌های مناسب و کارآمد برای احیای خاک‌های متأثر از نمک بسیار ضروری است. استفاده از روش‌های بیولوژیکی مانند کاربرد ریزجانداران مفید به‌عنوان اصلاح‌کننده‌های زیستی پتانسیل زیادی در بهبود شرایط رشد گیاه در خاک‌های شور دارد. هدف این مطالعه بررسی تأثیر کاربرد همزمان باکتری‌های *اسیدی‌تیوباسیلوس* و قارچ میکوریزی *فانلی فورمیس موسه* بر برخی متابولیت‌های فتوسنتزی و بیوشیمیایی ذرت بود. برای این منظور یک آزمایش گلخانه‌ای در قالب طرح کاملا تصادفی با آرایش فاکتوریل انجام شد. در این تحقیق اثر تیمارهای بیولوژیکی شامل: دو سطح قارچ میکوریزا (تلقیح و عدم تلقیح)، دو سطح شوری (۰/۹۶ و ۶ دسی زیمنس بر متر) و چهار سطح تلقیح باکتری‌های *اسیدی تیوباسیلوس* شامل شاهد (C)، *تیوباسیلوس تیواکسیدانس* (T)، *تیوباسیلوس فرواکسیدانس* (F)، *تیوباسیلوس تیواکسیدانس* و *تیوباسیلوس فرواکسیدانس* (T+F) در یک خاک بررسی شد. نتایج نشان داد که شوری غلظت کلروفیل a، b و کارتنوئید برگ را به‌ترتیب ۴۲/۹۰، ۶۸/۲۷ و ۵۰ درصد در مقایسه با شاهد کاهش داد. شوری باعث افزایش، غلظت پرولین (۴۲/۶۲ درصد)، نشت الکترولیت (۳۳/۳۰ درصد)، غلظت آنتوسیانین‌ها (۹۶/۳۶ درصد) و فلاونوئیدهای برگ (۸۴/۷۳ درصد) در مقایسه با خاک شاهد شد. تلقیح با قارچ میکوریزا در مقایسه با عدم تلقیح اثر قابل توجه و معنی‌داری بر همه پارامترهای مورد بررسی در هر دو خاک شور و شاهد داشت. در خاک شور تلقیح قارچ میکوریزا موجب کاهش نشت الکترولیت (۵۶/۷۵ درصد) و افزایش کلروفیل a (۳/۲ برابر)، کلروفیل b (۶/۶ برابر) کارتنوئید (۱/۳ برابر)، غلظت پرولین (۲۴/۳۹ درصد)، مقدار آنتوسیانین ها (۲۴/۰۷ درصد) و فلاونوئیدها (۲۰/۴۰ در صد) در گیاه شد. تاثیر تیمارهای باکتریایی بر پارامترهای مورد بررسی در گیاهان تلقیح شده با قارچ میکوریزا بیشتر از گیاهان تلقیح نشده بود. اثرگذاری بر مقدار پرولین، کلروفیل‌ها، آنتوسیانین و فلاونوئیدها در کاربرد توأم هر دو گونه باکتری بیشتر از تأثیر هر کدام به تنهایی بود. در خاک شور تلقیح همزمان قارچ میکوریزا با هر دو گونه باکتری موجب کاهش نشت الکترولیت (۱۴/۷۲ درصد) و افزایش کلروفیل a (۳۹/۸۰ درصد)، کلروفیل b (۱۰۶ درصد)، کارتنوئید (۵۰ درصد)، غلظت پرولین (۱۰/۱۲ درصد)، مقدار آنتوسیانین‌ها (۱۴/۱۷ درصد) و فلاونوئیدها (۴/۰۶ درصد) در گیاه در مقایسه با تیمار قارچ میکوریزا به تنهایی شد. نتایج نشان داد که این باکتری‌ها احتمالا می‌توانند به‌عنوان باکتری‌های کمک کننده میکوریزا در نظر گرفته شوند.

واژه‌های کلیدی: باکتری‌های کمک کننده میکوریزا، پرولین، خاک‌های متأثر از نمک، کود زیستی، همزیستی میکوریزی

مقدمه

کاهش کیفیت خاک در نتیجه دخالت انسان و به‌دنبال آن شوری و آلودگی خاک و بیابان‌زایی به یک معضل مهم در تولید محصولات کشاورزی تبدیل شده است (Li *et al*., 2015). شور شدن خاک یک اتفاق رایج در مناطق خشک و نیمه‌خشک است که بارندگی برای حذف نمک از ناحیه ریشه کافی نیست (Abbas *et al*., 2013). تصور می‌شود که روند شور شدن خاک‌ها که به سرعت در حال تشدید است عمدتاً ناشی از عدم درک علمی کشاورزان از فرآیندهایی است که منجر

۱، ۲ و ۳- به‌ترتیب دانشجوی سابق دکتری، دانشیار و استاد گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
(*- نویسنده مسئول: Email: halajnia@um.ac.ir)

https://doi.org/10.22067/jsw.2023.84667.1339

به توسعه شوری و مکانیسم‌های مقابله مؤثر می‌شود. با توجه به این شرایط، کشاورزان مجبور به کشت حبوبات و گیاهان علوفه‌ای مقاوم به نمک به جای کشت غلات متعارف هستند که بر امنیت غذایی خانوار تأثیر می‌گذارد (Asad *et al*., 2018). کشاورزانی که از شوری آگاه هستند ممکن است از تکنیک‌های کاهش و سازگاری منطقه‌ای مانند مدیریت بهتر زمین و آب، کاشت محصولات مقاوم به نمک، تنوع در الگوی کشت و تغییر گزینه‌های سرمایه‌گذاری خود (Mamba *et al*., 2016) استفاده کنند.

اصلاح کننده‌های آلی مانند کود گاوی، بقایای گیاهی، ضایعات و کودهای زیستی روش‌های مناسبی برای احیای خاک‌های شور هستند زیرا با کاهش شوری و افزایش حاصلخیزی خاک رشد محصول را تقویت می‌کنند (Chen *et al*., 2021b; Cui *et al*., 2021). کودهای شیمیایی معمولاً برای تأمین عناصر غذایی مورد نیاز برای رشد گیاه به منظور افزایش عملکرد محصول استفاده می‌شوند. اگرچه آنها رشد گیاه را تسریع می‌کنند، اما در رشد طبیعی و سلامت گیاه اختلال ایجاد کرده و کیفیت خاک را کاهش می‌دهند (Kandpal, 2021).

استفاده از گونه‌های میکروبی تقویت‌کننده رشد گیاهان رویکردی امیدوارکننده برای افزایش تولیدات کشاورزی در خاک‌های شور است (Chu *et al*., 2019). قارچ‌های میکوریزا می‌توانند رشد گیاه، فتوسنتز و ذخیره مواد مغذی، متابولیت‌ها و ترکیبات شیمیایی مفید را افزایش دهند و با مهار پاتوژن‌های قارچی، بیماری‌های گیاهی ناشی از خاک را کاهش دهند (Ratti *et al*., 2010; Oliveira *et al*., 2013). گیاهان می‌توانند از همزیستی با قارچ‌های میکوریزا آربوسکولار (AMF[1]) سود ببرند زیرا این همزیستی موجب بهبود وضعیت تغذیه، افزایش فراهمی و اثربخشی مصرف آب و در نتیجه کاهش اثرات تنش شوری می‌شود (Mohamed *et al*., 2014; Pirzad & Mohammadzadeh, 2018). برخی از مطالعات، رابطه بین قارچ‌های میکوریزا و ریزجانداران ریزوسفری که تصور می‌شود یکی از عوامل کلیدی تعیین‌کننده کلونیزاسیون و اثربخشی قارچ‌های میکوریزی هستند، را مورد بررسی قرار دادند. گاربای اولین کسی بود که در مورد ایده باکتری کمک کننده میکوریز (MHB[2]) بحث کرد (Garbaye, 1994). بخش مهمی از اثرات همزیستی میکوریزا، که رشد گیاه و جذب مواد مغذی را افزایش می‌دهد، ناشی از کارکرد باکتری‌های کمکی میکوریز (MHB) است. MHB همزیستی گیاه و قارچ را بهبود می‌بخشند و تأثیر مثبتی بر تعامل بین گیاهان و قارچ‌های میکوریز دارند (Frey-Klett *et al*., 2007). در مطالعه بورلز و همکاران تلقیح همزمان باکتری (MHB) *Curtobacterium citreum BE* و میکوریزا رشد گیاه *Cyperaceous* و تغذیه معدنی آن را در یک خاک اولترامافیک همگام با افزایش کلونیزاسیون ریشه افزایش داد (Bourles *et al*., 2020).

*MHB*تشکیل و رشد ریشه‌های ثانویه گیاه میزبان و احتمال تماس قارچ میکوریزا با ریشه را افزایش می‌دهد (Labbé *et al*., 2014; Armada *et al*., 2016).

سولفات توسط باکتری‌های تیوباسیلوس از طریق تشکیل تیوسولفات و تتراتیونات در طی فرآیند اکسیداسیون در دسترس قرار می گیرد، این باکتری‌ها رشد میکروارگانیسم‌های مفید خاک را تحریک کرده و اکسیداسیون بیولوژیکی گوگرد و آهن را در خاک تقویت می کنند که در نهایت موجب افزایش جذب مواد مغذی و عملکرد گیاه بین ۳۰ تا ۶۰ درصد می‌شود (Pokorna & Zabranska, 2015). باکتری-ها تیوباسیلوس می‌تواند با اکسید کردن گوگرد فراهمی عناصر غذایی را در خاک افزایش دهند. همچنین این باکتری‌ها قادر هستند سرعت تبادل کاتیونی خاک را افزایش دهند. این عمل با فعال‌سازی باکتری های مفید و تسهیل اکسید شدن زیستی در خاک انجام می‌شوند که این امر منجر به جذب بهتر عناصر غذایی و افزایش عملکرد می‌شود (Mohamed *et al*., 2014; Rahimzadeh *et al*., 2016). همچنین تولید اسید سولفوریک در نتیجه فعالیت این باکتری‌ها pH خاک را کاهش می‌دهد. هیدروژن تولید شده در تبادل با سدیم از سطح ذرات رس، شستشوی بعدی سدیم را تسهیل می‌کند و در نهایت موجب کاهش شوری خاک می‌شود (Garcia Junior, 1992). در خاک‌های شور، برهمکنش *تیوباسیلوس* و قارچ میکوریزا ممکن است باعث افزایش همزیستی ریشه گیاه با قارچ میکوریزا شده که این امر باعث افزایش جذب عناصر غذایی و بهبود رشد گیاه شود (Mostafavian *et al*., 2008). تلقیح همزمان *AMF* و باکتری‌های *تیوباسیلوس* اثرات مثبتی بر عملکرد گیاه پیاز داشتند (Mohamed *et al*., 2014). در مطالعه دیگر نشان داده شد که در مقایسه با گیاهان بدون تلقیح، تلقیح میکوریزا و *تیوباسیلوس* عملکرد گیاه *Lallemantia iberica* را افزایش داد و شاخص‌های مورفولوژیکی آن را بهبود بخشید (Heydari & Pirzad, 2021a). کاربرد همزمان میکوریزا و باکتری‌های *تیوباسیلوس* می‌توانند عملکرد و کیفیت متابولیت‌های ثانویه را افزایش دهند و در نتیجه بخشی از کاهش عملکرد گیاه را که در شرایط خاک شور رخ می‌دهد، جبران کنند (Heydari & Pirzad, 2021b).

در مطالعه انجام شده توسط ارن (Eren, 2022)، از *اسیدی تیوباسیلوس تیواکسدانس* به‌عنوان یکی از باکتری‌های محرک رشد نام برده شده است. در مطالعه انجام شده توسط دلیران و همکاران (Daliran *et al*., 2022) نیز اثر دو گونه باکتری اسیدی‌تیوباسیلوس بر حل کردن آهن از منابع مختلف و رشد گیاه سویا بررسی شد. نتایج نشان داده که در کاربرد این دو گونه باکتری به تنهایی، وزن خشک اندام هوایی گیاه افزایش داشت که البته این افزایش در مقایسه با شاهد معنی‌دار نبوده ولی با این حال کاربرد این دو باکتری به‌صورت همزمان

1- Arbuscular mycorrhizal fungi

2- Mycorrhiza helper bacteria

توانسته افزایش معنی‌داری در وزن خشک اندام هوایی گیاه در مقایسه با شاهد ایجاد کند (Daliran *et al*., 2022). این محققین همچنین افزایش غلظت آهن اندام هوایی گیاه سویا در تیمار باکتری‌ها *اسیدی تیوباسیلوس* (*تیواکسیدانس* + *فرواکسیدانس*) را گزارش دادند.

ذرت پرمحصول ترین غله جهان است و بعد از گندم و برنج مهمترین نقش را در تغذیه بشر دارد (Ai & Jane, 2016). علاوه بر این یکی از مهمترین گیاهان در تغذیه دام می‌باشد (FAO, 1947). از طرفی همزیستی گیاهان با قارچ *فانلی فورمیس موسه* یکی از متداول ترین همزیستی‌های میکوریزایی به شمار می‌رود. با توجه به گسترش شوری ثانویه در خاک‌های کشاورزی در این پژوهش مطالعه بر روی گیاه ذرت در همزیستی با قارچ میکوریزا در شرایط تنش شوری انجام شد. به‌دلیل مطالعات بسیار کم در خصوص کاربرد باکتری‌های تیوباسیلوس به‌عنوان یک MHB بر کارایی قارچ *فانلی فورمیس موسه* در خاک‌های شور این باکتری‌ها انتخاب شدند، هدف از این مطالعه بررسی ویژگی‌های فتوسنتزی و بیوشیمیایی ذرت در شرایط تنش شوری در پاسخ به تلقیح همزمان باکتری‌های اسیدی *تیوباسیلوس تیواکسیدانس* و *اسیدی تیوباسیلوس فرواکسیدانس* و قارچ میکوریزا و مقایسه آن با پاسخ‌های گیاهی در خاک شاهد بود.

مواد وروش‌ها

تهیه نمونه خاک، مایه تلقیحی قارچ *فانلی فورمیس موسه* و باکتری‌های *تیوباسیلوس*

نمونه خاک غیر شور سطحی ($EC=0.96\ dSm^{-1}$) از پردیس دانشگاه فردوسی مشهد جمع‌آوری شد. خاک بعد از هواخشک کردن برای تعیین برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی با استفاده از روش های آزمایشگاهی مرسوم از الک ۲ میلی‌متری عبور داده شد. خاک آهکی مورد مطالعه با pH برابر ۷/۶۲ و ۱۷/۷ درصد کربنات کلسیم معادل حاوی ۴۲ درصد ماسه، ۳۸ درصد سیلت و ۲۰ درصد رس بود. پتاسیم قابل دسترس خاک ۱۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، فسفر قابل دسترس ۴/۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم، کربن آلی (۰/۳ درصد) و نیتروژن کل ۵۳۹ میلی‌گرم بر کیلوگرم اندازه‌گیری شد. مایه تلقیح *فانلی فورمیس موسه* از شرکت زیست‌فناوران توران تهیه شد. مایه تلقیح میکوریزا حاوی خاک، بستر ریشه میکوریزی شبدر، اسپور قارچ (۵۰ اسپور در هر گرم مایه تلقیح) و هیف‌های خارجی قارچ گونه *فانلی فورمیس موسه* بود. باکتری‌های مزوفیل شامل دو نوع باکتری *اسیدی تیوباسیلوس تیواکسیدانس* (DSM 504) PTCC[1] No: 1692 و باکتری *اسیدی تیوباسیلوس فرواکسیدانس* (DSM 583) 1646 PTCC No: از مرکز تحقیقات علمی و صنعتی میکروبی ایران (PTCC) تهیه شد.

اجرای آزمایش و آماده‌سازی تیمارها

در این تحقیق اثر تیمارهای بیولوژیکی شامل: دو سطح قارچ میکوریزا (تلقیح و عدم تلقیح)، دو سطح شوری (۰/۹۶ و ۶ دسی‌زیمنس بر متر) و چهار سطح تلقیح باکتری‌های *اسیدی تیوباسیلوس* شامل شاهد (C)، *اسیدی تیوباسیلوس تیواکسیدانس* (T)، *اسیدی تیوباسیلوس فرواکسیدانس* (F)، *اسیدی تیوباسیلوس تیواکسیدانس* و *اسیدی تیوباسیلوس فرواکسیدانس* (T+F) در یک خاک بر برخی ویژِگی‌های فتوسنتزی و فیزیولوژیکی ذرت در شرایط گلخانه‌ای در قالب طرح کاملا تصادفی با آرایش فاکتوریل با سه تکرار با یکدیگر مقایسه شدند.

در ابتدا خاک هوا خشک و از الک ۲ میلی‌متری عبور داده شد. نمونه خاک در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱ اتمسفر به‌مدت ۱۵ دقیقه در اتوکلاو سترون شد. برای تهیه خاک شور ($EC=6\ dSm^{-1}$)، از مخلوط نمک‌های حاوی ۴/۱۸۲ گرم $MgSO_4\ 7H_2O$، ۳/۶۹۱ گرم $CaCl_2\ 2H_2O$، ۰/۰۹۱ گرم $NaCl$ و ۲/۰۳۶ گرم Na_2SO_4 استفاده شد (Barin *et al*., 2006). مقدار لازم از مخلوط نمک‌ها در یک پیش آزمایش برای دستیابی به قابلیت هدایت الکتریکی ۶ دسی زیمنس بر متر در گل اشباع (Carter & Gregorich 2007) بدست آمد. به‌طوری‌که مقدار ۱/۶ گرم از مخلوط نمک‌ها به هر کیلوگرم خاک غیر شور اضافه شد. علاوه بر این جهت افزایش فعالیت باکتری *اسیدی تیوباسیلوس تیواکسیدانس* به خاک شور و شاهد ۰/۲ گرم گوگرد عنصری به هر کیلوگرم خاک اضافه شد. در مجموع ۴۸ گلدان تهیه شد. قبل از کاشت، گلدان‌های پلاستیکی ۵ کیلوگرمی با الکل ۷۰ درصد ضدعفونی شدند. هر گلدان با ۳۰۰ گرم ماسه درشت سترون (اتوکلاو شده به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد) و سپس با ۵ کیلوگرم خاک سترون پر شد. برای به تعادل رسیدن خاک با نمک‌های اضافه شده همه گلدان‌ها به‌مدت یک ماه در شرایط رطوبتی ظرفیت مزرعه در گلخانه (شدت نور:۳۵۰ $\mu mol.m^{-1}.s^{-1}$، دما بین ۲۰ تا ۲۷ سانتی‌گراد و رطوبت بین ۵۵ تا ۶۵ درصد) نگهداری شدند.

پس از مخلوط کردن کامل خاک هر گلدان، تیمارهای تلقیح انجام شد. برای تهیه تلقیح باکتریایی، باکتری‌ها در محیطی که توسط مرکز PTCC پیشنهاد شده بود، رشد داده شدند. باکتری *اسیدی تیوباسیلوس فرواکسیدانس* در یک لیتر محیط مایع حاوی K_2HPO_4 (۰/۴ گرم)، $MgSO_4.7H_2O$ (۰/۴ گرم)، $(NH_4)_2SO_4$ (۰/۴ گرم) و $FeSO_4.7H_2O$ (۳۳/۳ گرم) کشت شد. pH محیط با استفاده از محلول ۰/۱ نرمال H_2SO_4 روی pH=۱/۴ تنظیم شد.

محیط کشت باکتری *اسیدی تیوباسیلوس تیواکسیدانس* شامل K_2HPO_4 (۳ گرم)، $MgCl_2.6H_2O$ (۰/۱ گرم)، NH_4Cl (۰/۱ گرم)،

1- Persian Type Culture Collection

$CaCl_2.2H_2O$ (۰/۱۴ گرم) و ۱۰ گرم پودر گوگرد در یک لیتر بود. pH محلول روی ۴/۲ تنظیم شد. کشت باکتری‌ها به مدت ۱۰ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور شیکردار با ۱۵۰ دور در دقیقه انجام شد. پس از رشد، سلول‌های باکتری با استفاده از سانتریفیوژ (۵۰۰۰ دور در دقیقه) جداسازی و سپس در آب مقطر سترون معلق شدند. ۳۰ میلی لیتر از سوسپانسیون سلولی باکتری (معادل ۱۰^{۷} CFU mL^{-1}) به هر گلدان براساس نوع تیمار اضافه شد. برای تلقیح همزمان دو گونه باکتری، از هر سوسپانسیون سلولی باکتری، ۱۵ میلی‌لیتر (۱۵+۱۵) به گلدان اضافه شد. تعداد سلول در هر میلی‌لیتر با استفاده از روش مک فارلند (Mcfarland, 1907) محاسبه شد. سوسپانسیون های باکتریایی بر اساس استاندارد ۰/۵ مک فارلند (۱۰^{۸} × ۱/۵CFU mL^{-1}) تهیه و سپس ده برابر (معادل ۱۰^{۷} CFU mL^{-1}) رقیق شدند. ۱۰۰ گرم مایه تلقیح قارچ میکوریزا به ناحیه رشد ریشه (در ۱۰ سانتی‌متری زیر سطح خاک) در هر گلدان اضافه شد. برای تیمارهای بدون مایه تلقیح قارچ میکوریزا، ۱۰۰ گرم مایه تلقیح قارچ میکوریزای سترون شده اضافه شد. علاوه بر این، ۱۰ میلی‌لیتر از مایه تلقیح *فانلی فورمیس موسه* فیلتر شده بدون اتوکلاو (<۱۰ میکرومتر) به هر تیمار اضافه شد تا اطمینان حاصل شود که جامعه میکروبی قابل مقایسه در همه گلدان‌ها وجود دارد (Duc *et al*., 2018). قبل از کاشت، بذور ذرت (Single Cross 704) با هیپوکلریت سدیم ۵ درصد سترون شد. پس از شستشو با آب مقطر، در هر گلدان ۵ عدد بذر در عمق ۵ سانتی‌متری کاشته شد. پس از ۱۴ روز در هر گلدان ۲ بوته متعارف و سالم نگهداری شد. رطوبت خاک در سطح ظرفیت مزرعه با توزین منظم گلدان‌ها در طول دوره رشد حفظ شد. کود اوره در طی ۳ مرحله (۱۰، ۲۰ و ۴۵ روز) به مقدار کل ۴۰۰ کیلوگرم بر هکتار در طول دوره رشد و کود سولفات پتاسیم به مقدار ۲۰۰ کیلوگرم بر هکتار قبل از کشت به گلدان‌ها اضافه شدند. پس از ۶۰ روز، گیاهان برداشت شدند و ریشه‌ها با آب مقطر شسته شدند. از هر گلدان چهار بخش از ریشه‌ها به قطعات ۱ سانتی‌متری تقسیم گردیدند و در محلول FAA (Formalin Acetic Acid Alcohol) برای مطالعه میکروسکوپی نگهداری شدند. برای رنگ‌آمیزی ریشه قطعات ریشه با ۱۰٪ KOH به‌مدت یک ساعت در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد تیمار شدند و متعاقباً مطابق روش فیلیپس و هایمن با ۰/۵٪ اسید لاکتیک گلیسرول–تریپان بلو رنگ‌آمیزی شدند (Phillips & Hayman, 1970).

برای تعیین درصد کلونیزاسیون ریشه از روش (Giovannetti and Mosse 1980) استفاده شد. مربعی به ابعاد ۱۰×۱۰ سانتی‌متر به مربعات کوچک‌تر به ابعاد ۰/۵ × ۰/۵ سانتی‌متر شبکه‌بندی و در زیر یک پتری‌دیش قرار داده شد. با استفاده از رابطه زیر درصد کلونیزه شدن ریشه محاسبه شد. این عمل برای هر تیمار در چهار بخش جداشده تکرار شد و میانگین اعداد حاصل، به‌عنوان درصد کلونیزاسیون در هر تیمار در نظر گرفته‌شد.

$$A = B/C \times 100 \qquad (۱)$$

A: درصد کلونیزاسیون ریشه، B: مکان‌های تلاقی اندام‌های میکوریزا با شبکه، C: مکان‌های تلاقی ریشه با شبکه (قسمت‌های میکوریزایی و قسمت‌های غیرمایکوریزایی).

برای اندازه‌گیری پارامترهای فتوسنتزی و بیوشیمیایی، نمونه‌های برگ تازه (برگ سوم روی ساقه) بعد از ۶۰ روز از هر گلدان جمع‌آوری شد.

کلروفیل a و b و کارتنوئید

برای اندازه‌گیری مقدار کلروفیل از روش (Arnon, 1967) استفاده شد. ابتدا ۰/۱۲۵ گرم برگ تر گیاهی در هاون چینی به همراه ۱۰ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد کاملا کوبیده و سپس با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. به‌طور جداگانه مقدار جذب نور در طول موج‌های ۶۶۳ نانومتر برای کلروفیل a، ۶۴۵ نانومتر برای کلروفیل b و ۴۷۰ نانومتر برای کارتنوئید در عصاره سانتریفیوژ شده قرائت شد. در نهایت با استفاده از فرمول‌های زیر میزان کلروفیل a، کلروفیل b و کارتنوئید برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر نمونه به‌دست آمد.

$$\text{Chl a} = \frac{(19.3\times A663-0.86\times A645)V}{100W} \qquad (۲)$$

$$\text{Chl b} = \frac{(19.3\times A645-3.6\times A663)V}{100W} \qquad (۳)$$

$$\text{Carotenoids} = \frac{100(A470)-3.27(\text{mg chl.A})-104(\text{mg chl.B})}{227} \qquad (۴)$$

V= حجم محلول صاف شده W=وزن تر نمونه بر حسب گرم

A= جذب نوردر طول موج‌های ۶۶۳، ۶۴۵ و ۴۷۰ نانومتر

نشت الکترولیت

نشت الکترولیت (EL[1]) از برگ‌ها براساس روش کامبوس و همکاران تعیین شد (Campos *et al*., 2003). به‌طور خلاصه، ۱۵ قطعه برگ تازه (تقریباً ۰/۵ سانتی‌متر مربع) در یک لوله آزمایش حاوی ۱۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه قرار داده شد و هدایت الکتریکی اولیه در محلول (Li) پس از ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد اندازه گیری شد. سپس محتویات لوله آزمایش در دمای ۱۲۰ درجه سانتی گراد به‌مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شد و رسانایی الکتریکی نهایی (Lf) پس از سرد شدن اندازه‌گیری شد. درصد نشت الکترولیت (EL) به‌صورت زیر محاسبه شد.

$$EL = (Li - L\ water) / (Lf - L\ water) \times 100 \qquad (۵)$$

که در آن L water رسانایی (dS/m) آب دیونیزه مورد استفاده

1- Electrical leakage

برای انجام آزمایش بود.

غلظت پرولین برگ

مقدار پرولین با استفاده از روش توصیف شده توسط لیشتاینر و همکاران اندازه‌گیری شد (Bates *et al*., 1973). برگ‌های تازه به وزن ۰/۱۲۵ گرم در ۴ میلی‌لیتر اسید سولفوسالیسیک ۰/۰۳ درصد در هاون خرد و عصاره حاصل تا زمان سانتریفیوژ روی یخ قرار داده شد. نمونه ها با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ و عصاره به‌دست آمده فیلتر شد. مخلوطی از ۲ میلی‌لیتر اسید استیک و ۲ میلی لیتر محلول اسید نین هیدرین به ۲ میلی‌لیتر عصاره صاف شده اضافه شد. مخلوط واکنش به‌مدت یک ساعت در حمام آب گرم با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و سپس به بستر یخ منتقل شد تا به دمای محیط برسد. پس از آن، ۴ میلی‌لیتر تولوئن به هر عصاره اضافه و تکان داده شد تا پرولین در تولوئن حل شود و لایه بالایی قرمز را تشکیل دهد. غلظت پرولین در طول موج ۵۲۰ نانومتر تعیین شد.

اندازه‌گیری غلظت آنتوسیانین

۰/۱ گرم برگ تازه گیاه در هاون چینی به همراه ۱۰ میلی‌لیتر متانول اسید (متانول خالص به اسید کلریدریک غلیظ با نسبت حجمی به‌ترتیب ۹۹ به ۱) کاملا سائیده شد و بعد از انتقال عصاره به لوله آزمایش، به‌مدت ۲۴ ساعت در تاریکی و یخچال قرار گرفت. سپس بدون تکان خوردن محلول، قسمت رویی آن جدا و جذب نور در محلول رویی در طول موج ۵۱۲ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. غلظت با استفاده از فرمول زیر و با در نظر گرفتن ضریب خاموشی $\varepsilon=$ ۳۳۰۰۰ سانتی‌متر بر مول محاسبه شد (Wagner, 1979).

$$A= \varepsilon\, b\, c \qquad (۶)$$

A= جذب b= (سانتی‌متر) عرض سل C= (مولار) غلظت محلول

اندازه‌گیری فلاونوئیدها

۰/۱ گرم برگ تازه گیاه در هاون چینی با ۱۰ میلی‌لیتر اتانول اسیدی (الکل اتیلیک و اسید استیک گلاسیال با نسبت حجمی به‌ترتیب ۹۹ به ۱) سابیده شد و پس از سانتریفیوژ عصاره با دور ۴۰۰۰ به‌مدت ۵ دقیقه، نمونه‌ها در حمام آب گرم با دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفتند. شدت جذب در طول موج ۳۳۰ نانومتر قرائت شد. در نهایت نتایج براساس غلظت گزارش شد (Krizek *et al*., 1998).

تحلیل آماری

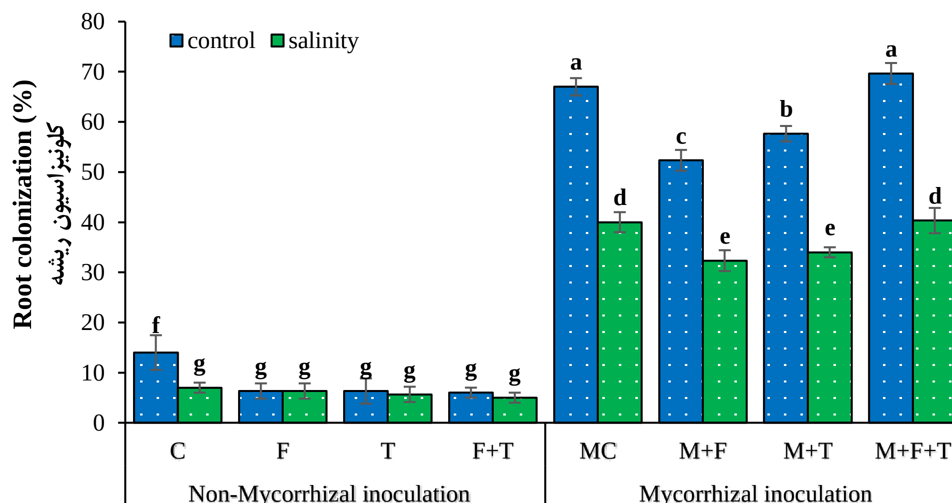
تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار JMP انجام شد. برای تجزیه و تحلیل تفاوت‌های معنی‌دار بین تیمارها از ANOVA سه طرفه استفاده شد. میانگین تیمارها با استفاده از آزمون LSD در $p \leq ۰/۰۵$ مقایسه شد.

نتایج و بحث

کلونیزاسیون ریشه

شکل ۱ اثرات متقابل تیمارهای آزمایشی بر درصد کلونیزاسیون ریشه را نشان می‌دهد. درصد کلونیزاسیون ریشه در تیمارهای تلقیح شده با قارچ میکوریزا نشان دهنده موفقیت‌آمیز بودن تلقیح بود. با این حال شوری موجب کاهش درصد کلونیزاسیون ریشه شد. میانگین درصد کلونیزاسیون ریشه در خاک غیر شور بین ۵۲/۳ تا ۶۹/۶ درصد و در خاک شور بین ۳۲/۳ تا ۴۰/۳ متغیر بود. در تیمارهای غیرمیکوریزی به دلیل شرایط غیر استریل در حین آماده‌سازی تیمارها و رشد گیاه، ۵ تا ۱۴ درصد کلونیزاسیون مشاهده شد (شکل ۱). شوری درصد کلونیزاسیون را در تیمارهای میکوریز کاهش داد. حیدری و پیرزاد (Heydari & Pirzad, 2020) نیز کاهش کلونیزاسیون ریشه را تحت تنش شوری گزارش کردند. اثرات مخرب تنش شوری بر جوانه‌زنی اسپور خاک، توسعه هیف و تکثیر در نهایت می‌تواند منجر به کاهش کلونیزاسیون میکوریزا شود. کاهش درصد کلونیزاسیون تحت تنش شوری ممکن است به‌طور غیرمستقیم ناشی از سرکوب رشد آربوسکول ها و کاهش در دسترس بودن مواد فتوسنتزی باشد (Bothe, 2012). نشان داده شده است که شوری رشد هیف را مهار می‌کند و باعث کاهش سرعت گسترش شبکه هیف میکوریزا می‌شود (Abdel Latef & Chaoxing, 2014). تأخیر در جوانه‌زنی اسپور در مواجهه با NaCl نیز توسط حاجی بلند گزارش شده است (Hajiboland, 2013).

تلقیح همزمان قارچ میکوریزا با هر یک از باکتری‌های *اسیدی تیوباسیلوس* باعث کاهش درصد کلونیزاسیون در هر دو خاک شور و غیر شور شد، تلقیح همزمان قارچ میکوریزا با هر دو باکتری تأثیر معنی داری بر درصد کلونیزاسیون ریشه نداشت (شکل ۱).



شکل ۱- برهمکنش شوری، تلقیح میکوریزی (M) و نوع تلقیح باکتری تیوباسیلوس بر درصد کلونیزاسیون ریشه

بدون تلقیح باکتری (C)، تلقیح با *اسیدی تیوباسیلوس تیواکسیدانس* (T)، تلقیح با *اسیدی تیوباسیلوس فرواکسیدانس* (F)، تلقیح همزمان دو گونه باکتری (T+F))

Figure 1- Interaction of salinity, mycorrhizal inoculation and bacteria species on presentage of root colonization

Non bacteria inoculation (C), inoculation with *Acidithiobacillous thiooxidans* (T), inoculation with *Acidithiobacillous ferrooxidans* (F) and co-inocoulation of both bacteria species (T+F)

حروف کوچک متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارها است (P < ۰/۰۵).

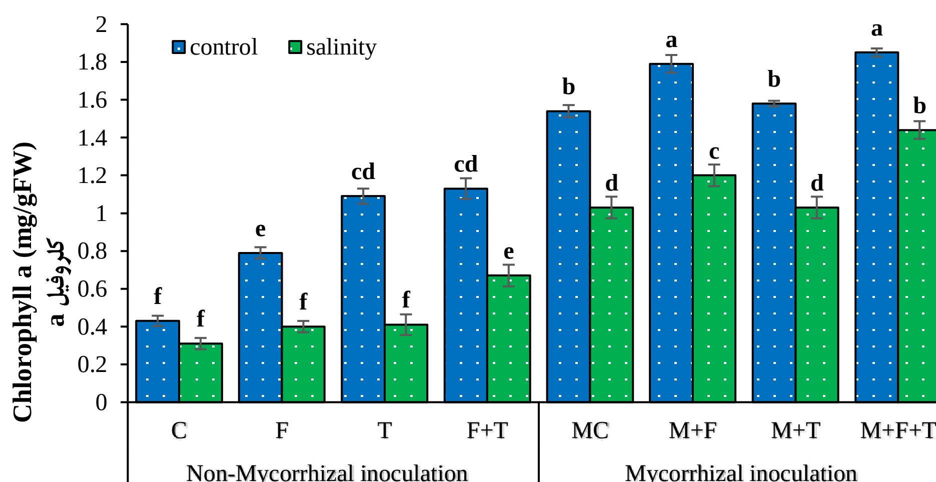
Means with the same letters are not significantly different at 5% probability.

اعتقاد بر این است که MHB می‌تواند با تولید هورمون‌های گیاهی بر استقرار AMF، جوانه‌زنی هاگ و رشد هیف تأثیر بگذارد. نشان داده شده است که این فیتوهورمون‌ها با افزایش تولید ترشحات ریشه و فعال کردن رشد هیف، سرعت کلونیزاسیون ریشه را افزایش می‌دهند (Barea *et al.*, 2005). حیدری و پیرزاد (Heydari & Pirzad, 2020) نشان دادند که تلقیح *تیوباسیلوس* و AMF تأثیر مثبتی بر کلونیزاسیون ریشه داشت. اما در این مطالعه تلقیح قارچ میکوریزا با باکتری‌های *اسیدی تیوباسیلوس* در خاک شور باعث کاهش درصد کلونیزاسیون ریشه شد. این کاهش درصد کلونیزاسیون ممکن است به دلیل افزایش رشد ریشه در این تیمارها باشد (نتایج گزارش نشده است) که در نتیجه درصد کلونیزاسیون در واحد سطح ریشه را کاهش داده است.

کلروفیل a: شوری اثر معنی‌داری بر غلظت کلروفیل a داشت، بطوری‌که در همه تیمارهای زیستی غلظت کلروفیل a در گیاهان رشد یافته در خاک شور به‌طور معنی‌داری کمتر از گیاهان کشت شده در خاک غیر شور بود (شکل ۲). در تیمار شاهد بدون تلقیح (C)، شوری غلظت کلروفیل a را ۲۷/۹ درصد کاهش داد هرچند که این کاهش نسبت به خاک شاهد معنی‌دار نبود. در خاک شاهد در همه تیمارهای ذرت همزیست با قارچ میکوریزا غلظت کلروفیل a به‌طور معنی‌داری بیشتر از خاک تلقیح نشده بود. تلقیح با قارچ میکوریزا در خاک شور و شاهد (C) موجب افزایش معنی‌دار کلروفیل a شد. در مقایسه با خاک شاهد (C) و شور تلقیح با قارچ میکوریزا به تنهایی (M) در خاک شاهد (C) و شور به‌ترتیب موجب افزایش ۳/۵۸ و ۳/۳۲ برابری کلروفیل a شد. در خاک شور، تلقیح خاک با باکتری‌های *اسیدی تیوباسیلوس* (تیمارهای F و T) اثر معنی‌داری بر کلروفیل a نداشتند. کاربرد باکتری های *اسیدی تیوباسیلوس* در خاک شاهد میکوریزی نشده اثر مثبت معنی‌دار بر مقدار کلروفیل a داشت. در حالی‌که در خاک شور غیر میکوریزی تنها اثر کاربرد همزمان دو باکتری (F+T) بر مقدار کلروفیل a معنی‌دار بود، با توجه به این که باکتری‌های تیوباسیلوس با اکسیداسیون گوگرد و تبدیل آن به سولفات موجب افزایش دسترسی به گوگرد و سایر عناصر غذای وابسته به pH مانند فسفر و آهن می‌شوند می‌توانند بر تشکیل کلروفیل مؤثر باشند. در تیمارهای میکوریزی در هر دو خاک شور و شاهد اثر تلقیح با باکتری *اسیدی تیوباسیلوس فرواکسیدانس* (M+F) و کاربرد همزمان دو گونه باکتری *اسیدی تیوباسیلوس* (M+F+T) بر کلروفیل a مثبت و معنی‌دار بود. بیشترین مقدار کلروفیل a در هر دو خاک شاهد C) و شور به‌ترتیب با ۲۰/۱ و ۳۹/۸۰ درصد افزایش نسبت به تیمار شاهد (M) در تیمار تلقیح شده با قارچ میکوریزا و هر دو گونه باکتری (M+F+T) مشاهده شد (شکل ۲).

نتایج نشان داد که تنش شوری باعث کاهش غلظت کلروفیل a در گیاه شد و اثر قارچ میکوریزا بر این افزایش معنی‌دار بود. این کاهش ناشی از تنش شوری بر روی اجزای رنگدانه‌های فتوسنتزی را می‌توان به تأثیر منفی نمک بر بیوسنتز و یا افزایش تخریب آنها (Kumar, 2012) با آسیب جدی به تیلاکوئیدهای کلروپلاست (Camejo *et al*., 2006) نسبت داد. احتمالاً به‌دلیل افزایش فعالیت آنزیم کلروفیلاز (متلاشی کننده ساختار کلروپلاست) در اثر افزایش غلظت یون‌های سدیم و کلر مقدار کلروفیل کاهش می‌یابد (Jaleel *et al*., 2007). افزایش محتوای کلروفیل به دنبال کاربرد *F. mosseae* در گیاهان تحت تنش شوری بوسیله ژانگ و همکاران نیز گزارش شده است (Zhang *et al*., 2018).

کلروفیل b: شوری اثر معنی‌داری بر غلظت کلروفیل b برگ داشت، بطوری‌که غلظت کلروفیل b در خاک شور به‌طور معنی‌داری کمتر از خاک شاهد (C) در تمامی تیمارها بود (شکل ۳). در تیمار شاهد (C)، شوری خاک غلظت کلروفیل b برگ را ۶۸/۴۲ درصد کاهش داد؛ به‌عبارت دیگر تأثیرپذیری کلروفیل b از شوری خاک بیشتر از کلروفیل a بود. در خاک شاهد (C)، همه تیمارهای بیولوژیکی یعنی تلقیح با باکتری‌های *اسیدی تیوباسیلوس* و قارچ میکوریزا در مقایسه با تیمار شاهد (M) تأثیر معنی‌داری بر غلظت کلروفیل b داشتند. در خاک شور، کلروفیل b به‌طور قابل توجهی با تلقیح قارچ میکوریز افزایش یافت. در تیمارهای غیر میکوریزی در خاک شور، تنها اثر تلقیح همزمان با هر دو گونه باکتری (F+T) بر کلروفیل b معنی‌دار بود و کاربرد هر یک از گونه‌های باکتری به تنهایی (F و T) تأثیر معنی‌دار بر کلروفیل b نداشتند. در حالی‌که در خاک شاهد (C)، تلقیح باکتریایی در همه تیمارها اثر مثبت و معنی‌دار بر کلروفیل b در مقایسه با عدم تلقیح داشت. بیشترین افزایش غلظت کلروفیل b در تیمارهای میکوریزی شده و در تلقیح همزمان با دو گونه باکتری (M+F+T) اندازه‌گیری شد. افزایش کلروفیل b در این تیمار در دو خاک شاهد (C) و شور در مقایسه با شاهد میکوریزی شده به‌ترتیب ۱/۴۵ و ۲/۰۶ برابر و در مقایسه با شاهد غیرمیکوریزی ۶/۸۹ و ۱۵/۸۳ برابر بود (شکل ۳). به‌طور کلی نتایج نشان داد که تنش شوری باعث کاهش و تلقیح قارچ میکوریزا موجب افزایش غلظت کلروفیل b در گیاه شد تلقیح همزمان باکتری‌های *اسیدی تیوباسیلوس* و قارچ میکوریزا بر افزایش غلظت کلروفیل b تأثیر مثبت داشت. نتایج نشان داد مقدار کلروفیل b بیشتر از کلروفیل a تحت تأثیر شوری کاهش یافت. کاهش کلروفیل b تحت تنش شوری را می‌توان به تشکیل ROS و در نتیجه مهار نوری و همچنین به کاهش گسترش سطح برگ و از این رو به جذب کمتر نور نسبت داد (Mostafa Heidari, 2011). بسیاری از دانشمندان نقش همزیستی میکوریزا را در بهبود کل رنگدانه‌های کلروفیلی گزارش کردند (Augé, 2001).



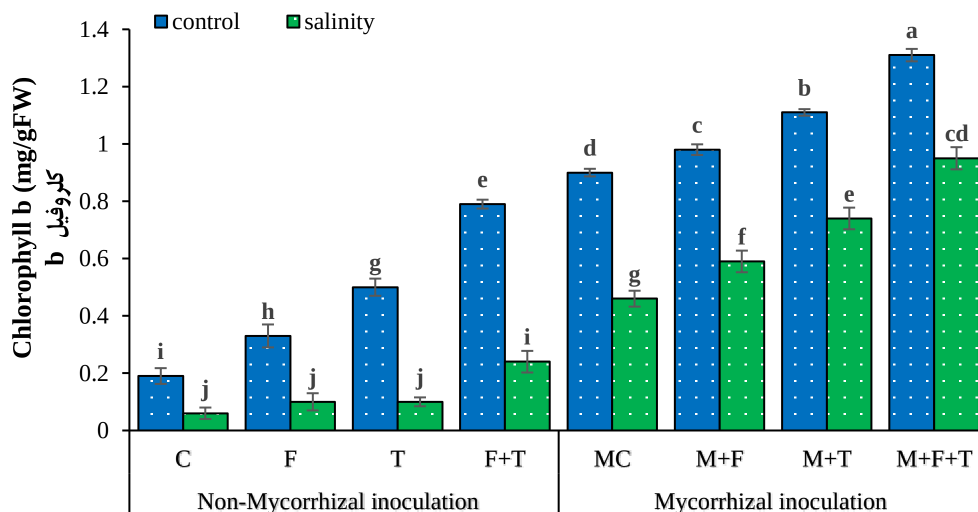
شکل ۲- برهمکنش شوری، تلقیح میکوریزی (M) و نوع تلقیح باکتری تیوباسیلوس بر کلروفیل a

بدون تلقیح باکتری (C)، تلقیح با *اسیدی تیوباسیلوس تیواکسیدانس* (T)، تلقیح با *اسیدی تیوباسیلوس فرواکسیدانس* (F)، تلقیح همزمان دو گونه باکتری (T+F)

Figure 2- Interaction of salinity, mycorrhizal inoculation and bacteria species on chlorophyll a
Non bacteria inoculation (C), inoculation with *Acidithiobacillous thiooxidans* (T), inoculation with *Acidithiobacillous ferrooxidans* (F) and co-inocoulation of both bacteria species (T+F)

حروف کوچک متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارها است ($P < ۰/۰۵$).

Means with the same letters are not significantly different at 5% probability.



شکل ۳- برهمکنش شوری، تلقیح میکوریزی (M) و نوع تلقیح باکتری تیوباسیلوس بر کلروفیل b

بدون تلقیح باکتری (C)، تلقیح با *اسیدی تیوباسیلوس تیواکسیدانس* (T)، تلقیح با *اسیدی تیوباسیلوس فرواکسیدانس* (F)، تلقیح همزمان دو گونه باکتری (T+F)

Figure 3- Interaction of salinity, mycorrhizal inoculation and bacteria species on chlorophyll b

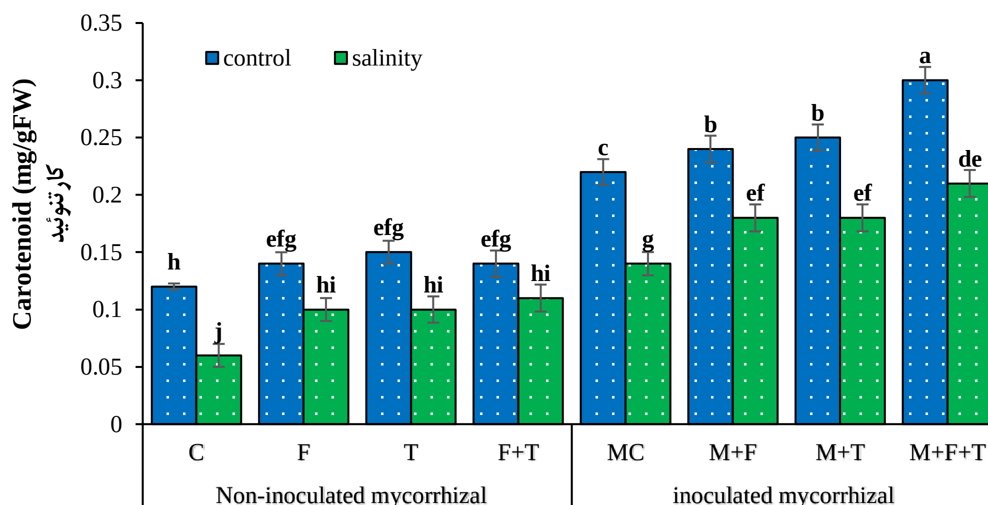
Non bacteria inoculation (C), inoculation with *Acidithiobacillous thiooxidans* (T), inoculation with *Acidithiobacillous ferrooxidans* (F) and co-inocoulation of both bacteria species (T+F)

حروف کوچک متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارها است ($P < ۰/۰۵$).

Means with the same letters are not significantly different at 5% probability.

کارتنوئید برگ گیاه: شوری اثر معنی‌داری بر محتوای کارتنوئید برگ داشت، بطوری‌که محتوای کارتنوئید برگ در خاک شور به‌طور معنی‌داری کمتر از خاک شاهد (C) در تمامی تیمارها بود (شکل ۴). در تیمار شاهد (C)، شوری خاک محتوای کارتنوئید برگ را ۵۰ درصد کاهش داد. در هر دو خاک شور و شاهد (C) حضور قارچ میکوریزا و باکتری موجب افزایش معنی‌دار محتوای کارتنوئید برگ در مقایسه به شاهد (C) شدند. تلقیح با قارچ میکوریزا اثر قابل توجه و معنی‌داری بر افزایش کارتنوئید در هر دو خاک شور و شاهد داشت و محتوای کارتنوئید در همه تیمارهای میکوریزی بیشتر از تیمارهای غیر میکوریزی بود. در تیمارهای تلقیح نشده با قارچ میکوریزا اثر نوع *باکتری اسیدی تیوباسیلوس* و کاربرد همزمان آنها بر مقدار کارتنوئید در هر دو خاک شور و شاهد معنی‌دار نبود. در خاک شور تلقیح شده با قارچ میکوریزا نیز نوع باکتری و کاربرد همزمان آنها از نظر تأثیر بر مقدار کارتنوئید تفاوت معنی‌دار با هم نداشتند. در حالی‌که در خاک شاهد تلقیح شده با قارچ میکوریزا کاربرد همزمان دو باکتری (M+F+T) موجب افزایش معنی‌دار مقدار کارتنوئید در مقایسه با کاربرد هر یک از باکتری-های *اسیدی تیوباسیلوس* به تنهایی شد. بیشترین مقدار کارتنوئید در این تیمار اندازه‌گیری شد (شکل ۴). نتایج نشان داد که تنش شوری باعث کاهش محتوای کارتنوئید در گیاه شد و اثر قارچ میکوریز بر این افزایش معنی‌دار بود. تلقیح همزمان باکتری *اسیدی تیوباسیلوس* و قارچ میکوریزا باعث افزایش غلظت کارتنوئید شد. کاروتنوئیدها با حذف رادیکال‌های اکسیژن به دفاع آنتی‌اکسیدانی در سلول‌های گیاهی کمک می‌کنند و در اتلاف انرژی اضافی فتوسیستم‌ها در حضور عوامل استرس‌زا نقش دارند (Singh & Thakur, 2018). تجمع کاروتنوئید در گیاهان تلقیح شده با قارچ میکوریزا تحت تنش شوری در شیرین بیان (*Glycyrrhiza glabra*) و گندم (*Triticum aestivum*) توسط (Amanifar *et al*., 2019; Eroğlu *et al*., 2020) گزارش شده است.

پرولین برگ گیاه: شوری اثر معنی‌داری بر غلظت پرولین برگ داشت، بطوری‌که غلظت پرولین برگ در خاک شور به‌طور معنی‌داری بیشتر از خاک غیر شور در تمامی تیمارها بود (شکل ۵). در تیمار شاهد (C)، شوری خاک غلظت پرولین برگ را ۴۲/۶۲ درصد افزایش داد. در خاک شاهد، تلقیح با باکتری‌های *اسیدی تیوباسیلوس* و قارچ میکوریزا در مقایسه با تیمار شاهد تأثیر قابل توجهی بر غلظت پرولین برگ نداشت. در خاک شور سطح پرولین در برگ گیاه به‌طور قابل توجهی با تلقیح قارچ میکوریزا افزایش یافت.



شکل ٤- برهمکنش شوری، تلقیح میکوریزی (M) و نوع تلقیح باکتری تیوباسیلوس بر کارتنوئید

بدون تلقیح باکتری (C)، تلقیح با *اسیدی تیوباسیلوس تیواکسیدانس* (T)، تلقیح با *اسیدی تیوباسیلوس فرواکسیدانس* (F)، تلقیح همزمان دو گونه باکتری (T+F))

Figure 4- Interaction of salinity, mycorrhizal inoculation and bacteria species on Carotenoid

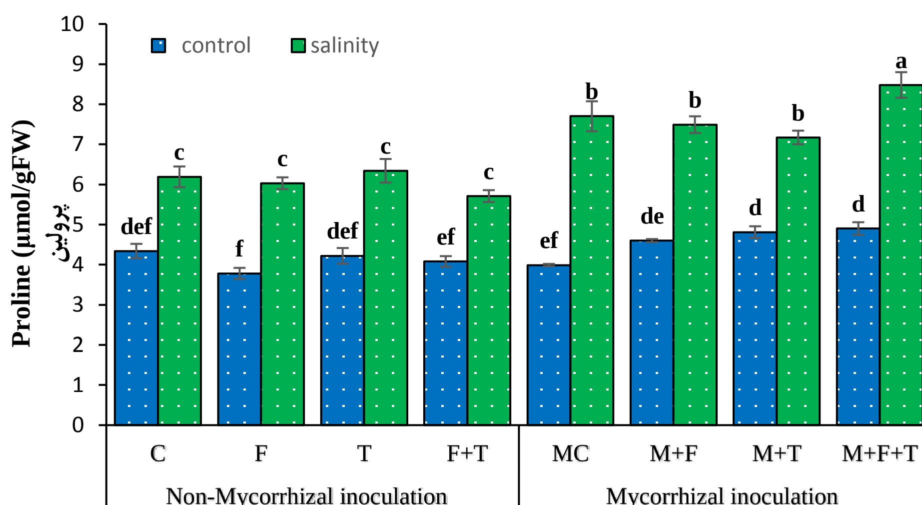
Non bacteria inoculation (C), inoculation with *Acidithiobacillous thiooxidans* (T), inoculation with *Acidithiobacillous ferrooxidans* (F) and co-inocoulation of both bacteria species (T+F)

حروف کوچک متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارها است ($P < ۰/۰۵$).

Means with the same letters are not significantly different at 5% probability.

در تیمارهای میکوریزا در خاک شور، اثر تلقیح باکتری تنها در کاربرد همزمان هر دو گونه باکتری (M+F+T) معنی‌دار بود و بیشترین افزایش غلظت پرولین با ۱۰/۱۲ درصد افزایش نسبت به تیمار شاهد میکوریزی و ۳۶/۹۹ درصد نسبت به تیمار شاهد غیر میکوریزی در این تیمار اندازه‌گیری شد (شکل ۵). به‌طور کلی نتایج نشان داد که تنش شوری باعث افزایش غلظت پرولین در گیاه شد و اثر قارچ میکوریزا بر این افزایش معنی‌دار بود. تلقیح همزمان هر دو گونه باکتری *اسیدی تیوباسیلوس* و قارچ میکوریزا بر افزایش غلظت پرولین تأثیر مثبت داشت. در شرایط تنش، گیاهان ممکن است به‌دلیل فعال شدن ژن‌های تنش، سطوح پرولین برگ را افزایش دهند (Bharti & Barnawal, 2019). تجمع پرولین در اکثر گونه‌های گیاهی تحت تنش شوری گزارش شده است (Hameed *et al.*, 2014). پرولین به حفظ رطوبت کمک می‌کند و تنظیم فشار اسمزی اثرات مخرب تنش شوری را کاهش می‌دهد (Lei *et al.*, 2016). پرولین نقش مهمی در حفظ پایداری پروتئین‌ها و غشاهای سلولی در محیط‌های شور دارد. برخی مطالعات گزارش کردند که پرولین به جای اینکه صرفاً به‌عنوان تنظیم کننده اسمزی مطرح باشد، می‌تواند به‌عنوان یک حسگر تنش ناشی از آسیب نمکی عمل کند (Abdel Latef *et al.*, 2009). در مقایسه با گیاهان غیرمیکوریزی، چندین مطالعه گزارش کرده‌اند که گیاهان میکوریزی سطوح بالاتری از پرولین را نشان دادند (Heydari & Pirzad, 2020; Liu *et al.*, 2022). تجمع پرولین در گیاهان تلقیح شده با قارچ میکوریزی به‌عنوان یک شاخص اثربخشی میکوریزا در نظر گرفته می‌شود، زیرا یک پاسخ متابولیکی خاص و یکی از مواد سازگار مهم در گیاهانی است که تحت تنش شوری رشد می‌کنند (Santander *et al.*, 2019).

نشت الکترولیت: تنش شوری باعث افزایش قابل توجه و معنی‌داری نشت الکترولیت در مقایسه با گیاهان بدون تنش شد (شکل ۶). در تیمار شاهد (C)، شوری خاک نشت الکترولیت برگ را ۳۳/۳۰ درصد افزایش داد. نشت الکترولیت در همه تیمارهای بیولوژیکی (باکتریایی و میکوریزی) در مقایسه با شاهد بدون تلقیح (C) در هر دو خاک شور و شاهد کاهش معنی‌دار نشان داد. در هر دو خاک شور و شاهد تلقیح نشده با قارچ میکوریزا اثر تیمارهای باکتریایی در مقایسه با شاهد (C) بر کاهش نشت الکترولیت معنی‌دار و مثبت بود ولی بین این تیمارها تفاوت معنی‌دار وجود نداشت.



شکل ۵- برهمکنش شوری، تلقیح میکوریزی (M) و نوع تلقیح باکتری تیوباسیلوس بر پرولین

بدون تلقیح باکتری (C)، تلقیح با *اسیدی تیوباسیلوس تیواکسیدانس* (T)، تلقیح با *اسیدی تیوباسیلوس فرواکسیدانس* (F)، تلقیح همزمان دو گونه باکتری (T+F))

Figure 5- Interaction of salinity, mycorrhizal inoculation and bacteria species on proline

Non bacteria inoculation (C), inoculation with *Acidithiobacillous thiooxidans* (T), inoculation with *Acidithiobacillous ferrooxidans* (F) and co-inocoulation of both bacteria species (T+F)

حروف کوچک متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارها است ($P < ۰/۰۵$).

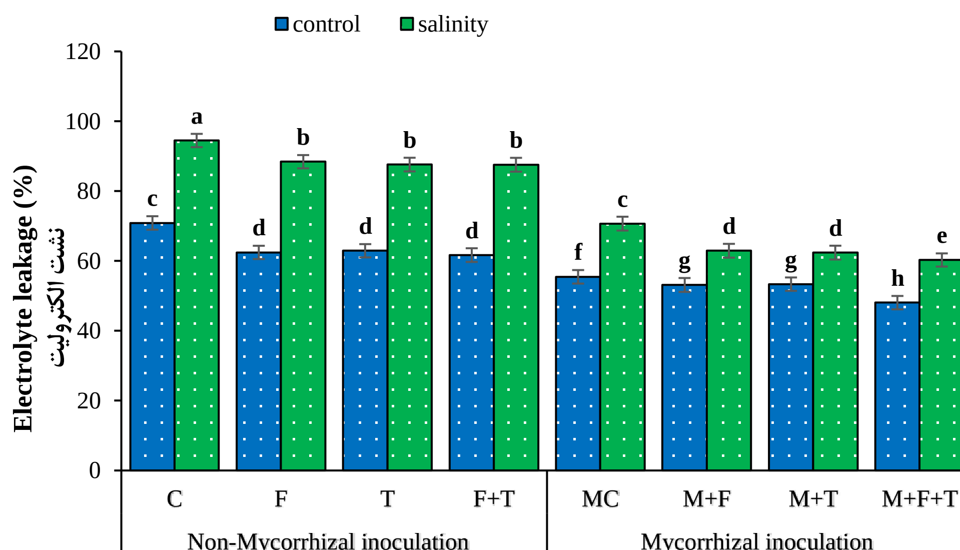
Means with the same letters are not significantly different at 5% probability.

در خاک‌های تلقیح شده با قارچ میکوریزا نیز اثر تلقح باکتریایی در مقایسه با تیمار تلقیح نشده (M) مثبت و معنی‌دار بود. بیشترین کاهش معنی‌دار در نشت الکترولیت در تلقیح همزمان قارچ میکوریزا با هر دو گونه باکتری مشاهده شد که نسبت به کاربرد جداگانه هر یک از گونه های باکتری (تیمارهای M+F و M+T) معنی‌دار بود (شکل ۶). نشت الکترولیت (EL) القا شده با نمک به‌عنوان یک مشخصه پاسخ به تنش در سلول‌های دست نخورده گیاهی مطرح است. نشت الکترولیت در گونه‌های مختلف گیاهی، اندام‌ها و انواع سلول‌هایی که تحت تنش شوری، گرما و خشکی رشد کرده‌اند گزارش شده است (Demidchik *et al*., 2014). مشخص شده است که تنش شوری از طریق جابجایی Ca^{+2} مرتبط با غشای سلولی توسط Na^{+} از پلاسمای سلول ریشه، جریان K^{+} را القا می‌کند که منجر به آسیب به نفوذپذیری غشاء و EL بالاتر می‌شود (Demidchik *et al*., 2014). نشان داده شده است که گیاهان گوجه‌فرنگی تحت تنش نمک تلقیح شده با قارچ میکوریزا، نفوذپذیری غشایی کمتری نسبت به گیاهان غیرمیکوریزی داشتند (He *et al*., 2007). گزارش شده است که باکتری مفید مقاوم به نمک *Pseudomonas* sp.اثرات نامطلوب تنش شوری را با کاهش EL از طریق تولید فیتوهورمون‌ها (ایندول استیک اسید و سیتوکینین) و بهبود پایداری غشاء کاهش داد (Fazal & Bano, 2016).

آنتوسیانین برگ: آنتوسیانین‌ها ترکیبات طبیعی هستند که در پاسخ به تنش‌های محیطی مختلف (اعم از غیر زنده و زنده مانند دماهای پایین، نمک و خشکی، کمبود تغذیه‌ای، آفات و بیماری‌ها و فلزات سنگین) سنتز می‌شوند و رنگ‌های مختلفی (مانند بنفش، قرمز و آبی) به بافت‌ها و اندام‌های گیاهی می‌دهند (Kaur *et al*., 2023). آنتوسیانین به‌عنوان مولکول‌های آنتی‌اکسیدانی از گیاهان در برابر ROS محافظت می‌کنند (Sarker *et al*., 2019). نتایج نشان داد که محتوای آنتوسیانین در نتیجه تنش شوری در همه تیمارهای آزمایش در مقایسه با خاک شاهد (C) افزایش معنی‌دار داشت (شکل ۷). در تیمار شاهد (C)، شوری خاک غلظت آنتوسیانین برگ را ۹۶/۳۶ درصد افزایش داد. در عدم کاربرد قارچ میکوریزا در هر دو خاک شور و شاهد اثر تلقیح باکتریایی بر افزایش غلظت آنتوسیانین مثبت و معنی‌دار بود و بیشترین تأثیر بر افزایش غلظت آنتوسیانین در تلقیح همزمان هر دو گونه باکتری مشاهده شد. تلقیح با قارچ میکوریزا در هر دو خاک شور و شاهد موجب افزایش معنی‌دار غلظت آنتوسیانین شد. کاربرد باکتری‌های *اسیدی تیوباسیلوس* در تیمارهای تلقیح شده با قارچ میکوریزا در خاک شاهد تأثیر مشخصی بر غلظت آنتوسیانین نداشت در حالی‌که در خاک شور موجب افزایش غلظت آنتوسیانین شد. بیشترین غلظت آنتوسیانین در تلقیح همزمان قارچ میکوریزا و هر دو گونه باکتری در خاک شور اندازه‌گیری شد (شکل ۷). در تنش شوری ظرفیت سیستم آنتی‌اکسیدانی برای کاهش تولید ROS ناشی از تنش ارتقا یافته و محتوای پرولین،

فنل و آنتوسیانین در تیمارهای تحت تنش شوری به‌طور قابل توجهی افزایش می‌یابد (Jahantigh *et al*., 2016). در مطالعه‌ای گزارش شده است که مقدار آنتوسیانین در زعفران با افزایش سطح شوری در گیاهان تلقیح شده توسط با قارچ میکوریزا افزایش یافت. بیشترین مقدار مربوط به تیمار AM + تحت تنش ۱۲۵ میلی‌مولار نمک بود که به‌طور معنی‌داری بیشتر از تمام سطوح تنش بود (Hamidian *et al*., 2023).

به‌طور کلی تنش شوری تولید متابولیت‌های ثانویه مانند فنل‌ها و آنتوسیانین‌ها را با تحریک مسیرهای فنیل پروپانوئید افزایش می‌دهد (Chon *et al*., 2012). تأثیر مثبت کاربرد باکتری *rhizobacteria* (PGPR) در کشت توت فرنگی در مواجهه با اثرات منفی تنش شوری با افزایش سطح پرولین و آنتوسیانین بوسیله کوک و همکاران (Koç *et al*., 2016) گزارش شده است.



شکل ٦- برهمکنش شوری، تلقیح میکوریزی (M) و نوع تلقیح باکتری تیوباسیلوس بر درصد نشت الکترولیت

بدون تلقیح باکتری (C)، تلقیح با *اسیدی تیوباسیلوس تیواکسیدانس* (T)، تلقیح با *اسیدی تیوباسیلوس فرواکسیدانس* (F)، تلقیح همزمان دو گونه باکتری ((T+F)

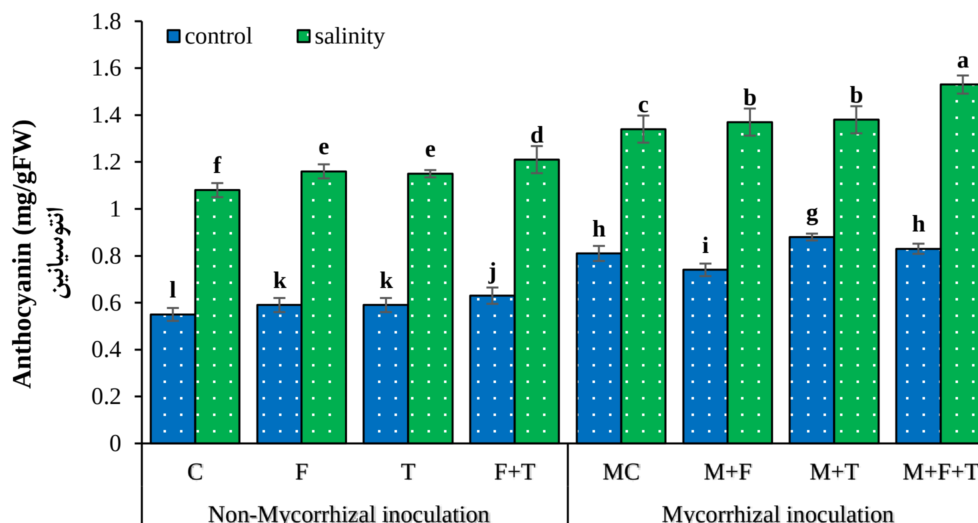
Figure 6- Interaction of salinity, mycorrhizal inoculation and bacteria species on Electrolyte leakage

Non bacteria inoculation ©, inoculation with *Acidithiobacillous thiooxidans* (T), inoculation with *Acidithiobacillous ferrooxidans* (F) and co-inocoulation of both bacteria species (T+F)

حروف کوچک متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارها است (P < ۰/۰۵).

Means with the same letters are not significantly different at 5% probability.

فلاونوئیدها برگ گیاه: فلاونوئیدها گروهی از متابولیت‌های ثانویه پلی‌فنلی گیاه مشتق از مسیر فنیل پروپانوئید می‌باشند که نقش مهمی را در پاسخ‌های گیاه به شرایط محیطی به‌خصوص تنش‌های زیستی و غیرزیستی بازی می‌کنند. نتایج نشان داد که محتوای فلاونوئیدها در نتیجه تنش شوری در همه تیمارهای آزمایشی به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (شکل ۸). در تیمار شاهد (C)، شوری خاک غلظت فلاونوئیدها برگ را ۱/۹ برابر افزایش داد. در تیمارهای غیر میکوریزی تلقیح باکتریایی در هر دو خاک شور و شاهد غلظت فلاونوئیدها را به‌طور معنی‌داری افزایش داد و تلقیح همزمان با هر دو گونه باکتری حداکثر افزایش را در غلظت فلاونوئیدها موجب شد. در خاک شاهد بین کاربرد باکتری‌های *اسیدی تیوباسیلوس تیواکسیدانس* و *اسیدی تیوباسیلوس فرواکسیدانس* تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد در حالی‌که در خاک شور اثر باکتری *اسیدی تیوباسیلوس تیواکسیدانس* بیشتر از باکتری *اسیدی تیوباسیلوس فرواکسیدانس* بود. تلقیح با قارچ میکوریزا موجب افزایش معنی‌دار غلظت فلاونوئیدها در همه تیمارها شد. در تیمارهای میکوریزی نیز تلقیح باکتریایی اثر مثبت و معنی‌دار بر افزایش غلظت فلاونوئیدها داشت. از این نظر در خاک شاهد تیمارهای باکتریایی تفاوت معنی‌دار با هم نداشتند و در خاک شور بیشترین اثر در تیمار کاربرد همزمان دو باکتری مشاهده شد (شکل ۸). این یافته‌ها نشان می‌دهد که باکتری‌های *اسیدی تیوباسیلوس* می‌تواند به‌عنوان فعال‌کننده سنتز متابولیت‌های ثانویه (فلاونوئیدها) در نظر گرفته شود.



شکل ۷- برهمکنش شوری، تلقیح میکوریزی (M) و نوع تلقیح باکتری تیوباسیلوس بر آنتوسیانین

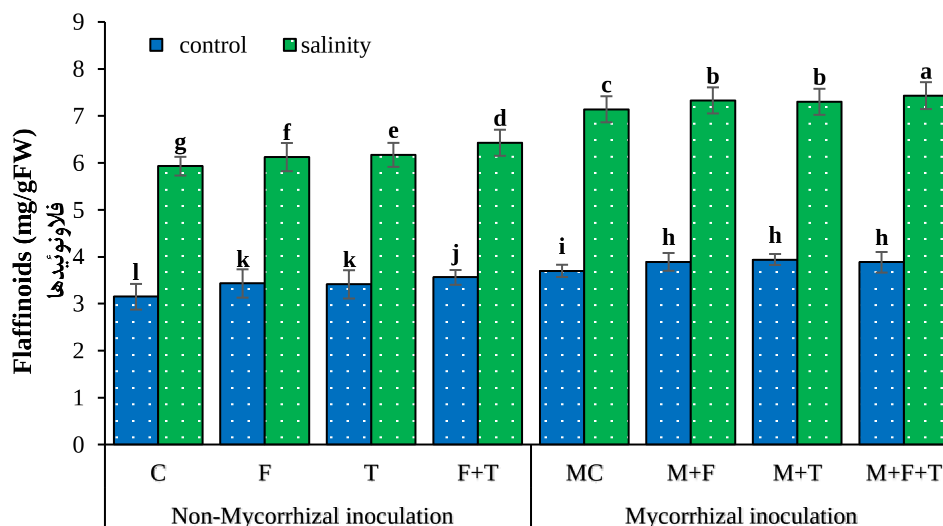
بدون تلقیح باکتری (C)، تلقیح با *اسیدی تیوباسیلوس تیواکسیدانس* (T)، تلقیح با *اسیدی تیوباسیلوس فرواکسیدانس* (F)، تلقیح همزمان دو گونه باکتری (T+F))

Figure 7- Interaction of salinity, mycorrhizal inoculation and bacteria species on Anthocyanin

Non bacteria inoculation (C), inoculation with *Acidithiobacillous thiooxidans* (T), inoculation with *Acidithiobacillous ferrooxidans* (F) and co-inocoulation of both bacteria species (T+F)

حروف کوچک متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارها است (P < ۰/۰۵).

Means with the same letters are not significantly different at 5% probability.



شکل ۸- برهمکنش شوری، تلقیح میکوریزی (M) و نوع تلقیح باکتری تیوباسیلوس بر فلاونوئیدها

بدون تلقیح باکتری (C)، تلقیح با *اسیدی تیوباسیلوس تیواکسیدانس* (T)، تلقیح با *اسیدی تیوباسیلوس فرواکسیدانس* (F)، تلقیح همزمان دو گونه باکتری (T+F))

Figure 8- Interaction of salinity, mycorrhizal inoculation and bacteria species on Flaffinoids

Non bacteria inoculation (C), inoculation with *Acidithiobacillous thiooxidans* (T), inoculation with *Acidithiobacillous ferrooxidans* (F) and co-inocoulation of both bacteria species (T+F)

حروف کوچک متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارها است (P < ۰/۰۵).

Means with the same letters are not significantly different at 5% probability.

سطوح بالاتر فلاونوئید می‌تواند نشان دهنده یک مکانیسم دفاعی در برابر تنش شوری باشد (Geetha *et al*., 2003). به خوبی مشخص شده است که وقتی گیاهان در وضعیت سالم هستند، محتوای کلروفیل آنها زیاد است و پلی‌فنول‌ها (فلاونوئیدها) نسبتا کمی در این زمان تولید می‌شوند. هنگامی که گیاهان در معرض شوری قرار می‌گیرند، سنتز کلروفیل مهار می‌شود و تعداد زیادی پلی‌فنل (مانند فلاونوئیدها، فنولیک اسید و پلی فنولیک امید) تولید می‌شود که باعث عدم تعادل مواد مغذی در گیاهان می‌شود (Chen *et al*., 2021a).

نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نیز نشان دهنده اثر بارز و مشخص قارچ میکوریزا بر افزایش کلروفیل و تولید متابولیت‌های مؤثر بر افزایش تحمل گیاه در برابر تنش شوری بود. علاوه بر این نتایج نشان داد که اگرچه کاربرد هر یک از گونه‌های باکتری *اسیدی تیوباسیلوس فرواکسیدانس* و *اسیدی تیوباسیلوس تیواکسیدانس* به تنهایی بر پارامترهای مورد اندازه گیری در خاک شور و شاهد مؤثر بود، تلقیح توام هر دو گونه باکتری-های *اسیدی تیوباسیلوس* و قارچ میکوریزا بیشترین تأثیر را بر افزایش کلروفیل، افزایش تولید پرولین، آنتوسیانین‌ها و فلاونوئیدها و کاهش نشت الکترولیت و در نتیجه افزایش تحمل به تنش شوری داشت؛ به عبارت دیگر این باکتری‌ها را می‌توان به‌عنوان باکتری‌های همیار میکوریزا در نظر گرفت که فعالیت آنها می‌تواند عملکرد قارچ میکوریزا را بهبود بخشد. از طرف دیگر همزیستی قارچ میکوریزا ممکن است با تغییر شرایط خاک و محیط پیرامون ریشه، بویژه احتمالا کاهش pH کارایی این باکتری‌ها را افزایش داده باشد. با این حال، آزمایش‌های بیشتر در محیط‌های گلخانه‌ای و مزرعه با سایر گونه‌های گیاهی برای تأیید این یافته‌ها ضروری است.

References

1. Abbas, A., Khan, S., Hussain, N., Hanjra, M.A., & Akbar, S. (2013). Characterizing soil salinity in irrigated agriculture using a remote sensing approach. *Physics and Chemistry of the Earth*, 55–57, 43–52. https://doi.org/10.1016/j.pce.2010.12.004
2. Abdel Latef, A.A., Shaddad, M.A.K., Ismail, A.M., & Abu Alhmad, M.F.A. (2009). Benzyladenine can alleviate saline injury of two Roselle (*Hibiscus sabdariffa*) cultivars via equilibration of cytosolutes including anthocyanins. *International Journal of Agriculture and Biology*, *11*, 151–157
3. Abdel Latef, A.A.H., & Chaoxing, H. (2014). Does inoculation with *Glomus mosseae* improve salt tolerance in pepper plants? *Journal* of *Plant Growth Regulation*, *33*, 644–653. https://doi.org/10.1007/s00344-014-9414-4
4. Ai, Y., & Jane, J.L. (2016). Macronutrients in corn and human nutrition. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *15*, 581–598. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12192
5. Amanifar, S., Khodabandeloo, M., Mohseni Fard, E., Askari, M.S., & Ashrafi, M. (2019). Alleviation of Salt Stress and Changes in Glycyrrhizin Accumulation by Arbuscular Mycorrhiza in Liquorice (*Glycyrrhiza glabra*) Grown Under Salinity Stress. *Environmental and Experimental Botany*, 160, 25–34. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2019.01.001
6. Armada, E., Probanza, A., Roldán, A., &. Azcón, R. (2016). Native Plant Growth Promoting Bacteria *Bacillus thuringiensis* and Mixed or Individual Mycorrhizal Species Improved Drought Tolerance and Oxidative Metabolism in *Lavandula dentata* Plants. *Journal* of *Plant Physiology*,192, 1–12. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2015.11.007
7. Arnon, A.N. (1967). Method of Extraction of Chlorophyll in the Plants. *Agronomy Journal*, 23, 112–12.1
8. Asad, S.Q., Tesfaye, E., & Melese, M. (2018). Prospects of Alternative Copping Systems for Salt-Affected Soils in Ethiopia. *Journal of Soil Science and Environmental Management*, 9, 98–107. https://doi.org/10.5897/jssem2018.0686
9. Augé, R.M. (2001). Water Relations, Drought and Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *Mycorrhiza*, 11, 3–42. https://doi.org/10.1007/s005720100097
10. Barea, J.M., Pozo, M.J., Azcon, R., & Azcon-Aguilar, C. (2005). Microbial Co-Operation in the Rhizosphere. *Journal* of *Experimental Botany*, 56, 1761–1778. https://doi.org/10.1093/jxb/eri197
11. Barin, M., Ali, A.N., & Samadi, A. (2006). Effects of NaCl-Induced and Salts Mixture Salinity on Leaf Proline and Growth of Tomato in Symbiosis with Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *ranian Journal of Agriculture* Science, 37(1), 139-147. (In Persian).
12. Bates, L.S., Waldren, R.P., & Teare, I.D. (1973). Rapid determination of free Proline for Water-Stress Studies. *Plant and Soil*, 39, 205–207. https://doi.org/10.1007/BF00018060
13. Bharti, N., & Barnawal, D. (2019). Amelioration of salinity stress by PGPR. In: PGPR amelioration in sustainable agriculture. *Food Security and Environmental Management*, 85–106. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815879-1.00005-7
14. Bothe, H. (2012). Arbuscular mycorrhiza and salt tolerance of plants. *Symbiosis*, *58*, 7–16. https://doi.org/10.1007/s13199-012-0196-9

15. Bourles, A., Guentas, L., Charvis, C., Gensous, S., Majorel, C., Crossay, T., Cavaloc, Y., Burtet-Sarramegna, V., Jourand, P., & Amir, H. (2020). Co-inoculation with a bacterium and arbuscular mycorrhizal fungi improves root colonization, plant mineral nutrition, and plant growth of a Cyperaceae plant in an ultramafic soil. *Mycorrhiza*, *30*, 121–131. https://doi.org/10.1007/s00572-019-00929-8
16. Camejo, D., Jiménez, A., Alarcón, J.J., Torres, W., Gómez, J.M., & Sevilla, F. (2006). Changes in photosynthetic parameters and antioxidant activities following heat-shock treatment in tomato plants. *Functional Plant Biology*, *33*, 177–187. https://doi.org/10.1071/FP05067
17. Campos, P.S., Quartin, V., Ramalho, J.C., & Nunes, M.A. (2003). Electrolyte leakage and lipid degradation account for cold sensitivity in leaves of *Coffea* sp. plants. *Journal of Plant Physiology*, *160*, 283–292. https://doi.org/10.1078/0176-1617-00833
18. Carter, M.R., & Gregorich, E.G. (2007). *Soil sampling and methods of analysis.* CRC press. https://doi.org/10.1201/9781420005271
19. Chen, M., Wang, Y., Chen, G., Ji, R., & Shi, W. (2021a). Effects of nitrogen fertilizer levels on nitrogen balance index and yield of hybrid super rice. *Soils*, *53*, 700–706. https://doi.org/10.13758/j.cnki.tr.2021.04.005
20. Chen, M., Zhang, S., Liu, L., Wu, L., & Ding, X. (2021b). Combined organic amendments and mineral fertilizer application increase rice yield by improving soil structure, P availability and root growth in saline-alkaline soil. *Soil and Tillage Research*, *212*, 105060. https://doi.org/10.1016/j.still.2021.105060
21. Chon, S.U., Boo, HO., Heo, B.G., & Gorinstein, S. (2012). Anthocyanin content and the activities of polyphenol oxidase, peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase in lettuce cultivars. *International Journal* of *Food Sciences* and *Nutrition*, *63*, 45–48. https://doi.org/10.3109/09637486.2011.595704
22. Chu, T.N., Tran, B.T.H., Van Bui, L., & Hoang, M.T.T. (2019). Plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas PS01* induces salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Research Notes*, *12*, 1–7. https://doi.org/10.1186/s13104-019-4046-1
23. Csonka, L.N. (1989). Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiology Reviews*, *53*, 121–147. https://doi.org/10.1128/mmbr.53.1.121-147.1989
24. Cui, Q., Xia, J., Yang, H., Liu, J., & Shao, P. (2021). Biochar and effective microorganisms promote *Sesbania cannabina* growth and soil quality in the coastal saline-alkali soil of the yellow river Delta, China. *Science* of the *Total Environment*, *756*, 143801. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143801
25. Daliran, T., Halajnia, A., & Lakzian, A. (2022). Thiobacillus bacteria-enhanced iron biofortification of soybean in a calcareous soil enriched with ferrous sulfate, mill scale, and Pyrite. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, *22*, 2221–2234. https://doi.org/10.1007/s42729-022-00804-0
26. Demidchik, V., Straltsova, D., Medvedev, S.S., Pozhvanov, G.A., Sokolik, A., & Yurin V. (2014). Stress-induced electrolyte leakage: The role of K+-Permeable channels and involvement in programmed cell death and metabolic adjustment. *Journal of Experimental Botany*, *65*, 1259–1270. https://doi.org/10.1093/jxb/eru004
27. Duc, N.H., Csintalan, Z., & Posta, K. (2018). Arbuscular mycorrhizal fungi mitigate negative effects of combined drought and heat stress on tomato plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, *132*, 297–307. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.09.011
28. Eren, E. (2022). The effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) on yield and some guality parameters during shelf life in white button mushroom (*Agaricus bisporus* L.). *Journal of Fungi*, *27*, 10-16. https://doi.org/10.3390/jof8101016
29. Eroğlu, G., Cabral, C., Ravnskov, S., Bak Topbjerg, H., & Wollenweber, B. (2020). Arbuscular mycorrhiza influences carbon-use efficiency and grain yield of wheat grown under pre- and post-anthesis salinity stress. *Plant Biology*, *22*, 863–871. https://doi.org/10.1111/plb.13123
30. FAO. (1947). Food and agriculture organization of the United Nations. *International Organization*, *1*, 350–353. https://doi.org/10.1017/S0020818300006160
31. Fazal, A., & Bano, A. (2016). Role of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR), biochar, and chemical fertilizer under salinity stress. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, *47*, 1985–1993. https://doi.org/10.1080/00103624.2016.1216562
32. Frey-Klett, P., Garbaye, J., & Tarkka, M. (2007). The mycorrhiza helper bacteria revisited. *New Phytologist*, *176*, 22–36. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02191.x
33. Garbaye, J. (1994). Tansley Review No. 76 Helper Bacteria: A new dimension to the mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist*, *128*, 197–210. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1994.tb04003.x
34. Garcia Junior, O. (1992). O enxofre e suas transformações microbianas. *Microbiol do solo*, 319–329
35. Geetha, S., Sai Ram, M., Mongia, S.S., Singh, V., Ilavazhagan, G., & Sawhney, R.C. (2003). Evaluation of antioxidant activity of leaf extract of Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) on chromium (VI) induced oxidative stress in albino rats. *Journal of Ethnopharmacology*, *87*, 247–251. https://doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00154-5
36. Giovannetti, M., & Mosse, B. (1980). An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist*, *84*, 489–500. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1980.tb04556.x
37. Hajiboland, R. (2013). Role of arbuscular mycorrhiza in amelioration of salinity. In: Ahmad, P., Azooz, M.M.,

Prasad, M.N.V. (eds) *Salt Stress in Plants*. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6108-1_13

38. Hameed, A., Dilfuza, E., Abd-Allah, E.F., Hashem, A., Kumar, A., & Ahmad, P. (2014). Salinity stress and arbuscular mycorrhizal symbiosis in plants. In: Miransari, M. (eds) *Use of Microbes for the Alleviation of Soil Stresses*, Volume 1. Springer, New York, NY. 139–159. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-9466-9_7
39. Hamidian, M., Movahhedi-Dehnavi, M., Sayyed, R.Z., Almalki, W.H., Gafur, A., & Fazeli-Nasab, B. (2023). Author correction: Co-application of mycorrhiza and methyl jasmonate regulates morpho-physiological and antioxidant responses of *Crocus sativus* (Saffron) under salinity stress conditions. *Scientific Reports*, *13*, 73-78. https://doi.org/10.1038/s41598-023-35118-3
40. He, Z.Q,. He, C.X., Zhang, Z.B., Zou, Z.R., & Wang, H.S. (2007). Changes of antioxidative enzymes and cell membrane osmosis in tomato colonized by arbuscular mycorrhizae under NaCl stress. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*, *59*, 128–133. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2007.04.023
41. Heydari, S., & Pirzad, A. (2021a). Improvement of the yield-related response of mycorrhized *Lallemantia iberica* to salinity through sulfur-oxidizing bacteria. *Journal* of the *Science* of *Food* and *Agriculture*, *101*, 3758–3766. https://doi.org/10.1002/jsfa.11007
42. Heydari, S., & Pirzad, A. (2021b). Efficiency of *Funneliformis mosseae* and *Thiobacillus* sp. on the secondary metabolites (essential oil, seed oil and mucilage) of *Lallemantia iberica* under salinity stress. *Journal of Horticultural Science* and *Biotechnology*, *96*, 249–259. https://doi.org/10.1080/14620316.2020.1833764
43. Heydari, S., & Pirzad, A. (2020). Mycorrhizal fungi and *Thiobacillus* co-inoculation improve the physiological indices of *Lallemantia iberica* under salinity stress. *Current Microbiology*, *77*, 2523–2534. https://doi.org/10.1007/s00284-020-02034-y
44. Jahantigh, O., Najafi, F., Naghdi Badi, H.A., Khavari-Nejad, R.A., & Sanjarian, F. (2016). Changes in antioxidant enzymes activities and proline, total phenol and anthocyanine contents in *Hyssopus officinalis* L. plants under salt stress. *Biologia Futura*, *67*, 195–204. https://doi.org/10.1556/018.67.2016.2.7
45. Jaleel, C.A., Manivannan, P., Lakshmanan, G.M.A., Sridharan, R., & Panneerselvam, R. (2007). NaCl as a physiological modulator of proline metabolism and antioxidant potential in *Phyllanthus amarus*. *Comptes Rendus Biologies*, *330*, 806–813. https://doi.org/10.1016/j.crvi.2007.08.009
46. Kandpal, G. (2021). Review on impact of chemical fertilizers on environment. *International Journal of Modern Agriculture*, *10*(1), 758–763.
47. Karlidag, H., Yildirim, E., Turan, M., Pehluvan, M., & Donmez, F. (2013). Plant growth-promoting rhizobacteria mitigate deleterious effects of salt stress on strawberry plants (*Fragaria ananassa*). *HortScience*, *48*, 563–567. https://doi.org/10.21273/hortsci.48.5.563
48. Kaur, S., Tiwari, V., Kumari, A., Chaudhary, E,m Sharma, A., Ali, U., & Garg, M. (2023). Protective and defensive role of anthocyanins under plant abiotic and biotic stresses: An emerging application in sustainable agriculture. *Journal of Biotechnology*, *361*, 12–29. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2022.11.009
49. Koç, A., Balcı, G., Ertürk, Y., Keles, H., Bakoğlu, N., & Ercişli, S. (2016). Influence of arbuscular mycorrhizae and plant growth promoting rhizobacteria on proline content, membrane permeability and growth of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) under salt stress. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, *89*, 89-97. https://doi.org/10.5073/JABFQ.2016.089.011
50. Krizek, D.T., Britz, S.J., & Mirecki, R.M. (1998). Inhibitory effects of ambient levels of solar UV-A and UV-B radiation on growth of CV. new red fire lettuce. *Plant Physiology*, *103*, 1–7. https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1998.1030101.x
51. Kumar, S. (2012). Assay guided comparison for enzymatic and non-enzymatic antioxidant activities with special reference to medicinal plants. *Antioxidant Enzyme*, *14*, 382–400. https://doi.org/10.5772/50782
52. Labbé, J.L., Weston, D.J., Dunkirk, N., Pelletier, D.A., & Tuskan, G.A. (2014). Newly identified helper bacteria stimulate ectomycorrhizal formation in populus. *Front Plant Science*, *5*, 579. https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00579
53. Lei, P., Xu, Z., Liang, J., Luo, X., Zhang, Y., Feng, X., & Xu, H. (2016). Poly (γ-glutamic acid) enhanced tolerance to salt stress by promoting proline accumulation in *Brassica napus* L. *Plant Growth Regulation*, *78*, 233–241. https://doi.org/10.1007/s10725-015-0088-0
54. Li, P., Qian, H., Howard, K.W.F., & Wu, J. (2015). Building a new and sustainable 'silk road economic Belt' *Environmental Earth Sciences*, *74*, 7267–7270. https://doi.org/10.1007/s12665-015-4739-2
55. Liu, H., Tang, H., Ni, X., Zhang, Y., & Wang,Y. (2022). Impact of an arbuscular mycorrhizal fungal inoculum and exogenous methyl jasmonate on the performance of tall fescue under saline-alkali condition. *Frontiers in Microbiology*, *13*, 902667. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.902667
56. Mamba, S.F., Salam, A., & Peter, G. (2016). Farmers' perception of climate change a case study in Swaziland. *Journal of Food Security*, *3*, 47–61. https://doi.org/10.12691/jfs-3-2-3
57. Mcfarland, J. (1907). The nephelometer: An instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *The Journal of the American Medical Association*, XLIX, 1176–1178. https://doi.org/10.1001/jama.1907.25320140022001f

58. Mohamed, A.A., Eweda, W.E.E., Heggo, A.M., & Hassan, E.A. (2014). Effect of dual inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and sulphur-oxidising bacteria on onion (*Allium cepa* L.) and maize (*Zea mays* L.) grown in sandy soil under green house conditions. *Annals of Agricultural Sciences*, *59*, 109–118. https://doi.org/10.1016/j.aoas.2014.06.015
59. Heidari, M. (2011). Effects of salinity stress on growth, chlorophyll content and osmotic components of two Basil (*Ocimum basilicum* L.) genotypes. *African Journal of Biotechnology*, *11*, 379–384. https://doi.org/10.5897/ajb11.2572
60. Mostafavian, S.R., Pirdashti, H., Ramzanpour, M.R., Andarkhor, A.A., & Shahsavari, A. (2008). Effect of mycorrhizae, *Thiobacillus* and sulfur nutrition on the chemical composition of soybean [*Glycine max* (L.)] Merr. Seed. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, *11*, 826–835. https://doi.org/10.3923/pjbs.2008.826.835
61. Oliveira, M de S., da Silva Campos, M.A., de Albuquerque, U.P., & da Silva, F.S.B. (2013). Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) Affects Biomolecules Content in *Myracrodruon urundeuva* Seedlings. *Industrial Crops* and *Products*, 50, 244–247. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.07.041
62. Phillips, J.M., & Hayman, D.S. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Transactions of the *British* Mycological *Society*, *55*, 158-IN18. https://doi.org/10.1016/s0007-1536(70)80110-3
63. Pirzad, A., & Mohammadzadeh, S. (2018). Water use efficiency of three mycorrhizal Lamiaceae species (*Lavandula officinalis*, *Rosmarinus officinalis* and *Thymus vulgaris*). *Agricultural Water Management*, *204*, 1–10. https://doi.org/10.1016/j.agwat.2018.03.020
64. Pokorna, D., & Zabranska, J. (2015). Sulfur-oxidizing bacteria in environmental technology. *Biotechnology Advances*, *33*, 1246–1259. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.02.007
65. Rahimzadeh, S., Sohrabi, Y., Heidari, G., Pirzad, A., & Ghassemi Golezani, K. (2016). Effect of bio-fertilizers on the essential oil yield and components isolated from *Dracocephalum moldavica* L. using nanoscale injection method. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, *19*, 529–541. https://doi.org/10.1080/0972060X.2014.935057
66. Ratti, N., Verma, H.N., & Gautam, S.P. (2010). Effect of *Glomus* species on physiology and biochemistry of *Catharanthus roseus*. *Indian Journal of Microbiology*, *50*, 355–360. https://doi.org/10.1007/s12088-010-0012-2
67. Santander, C., Sanhueza, M., Olave, J., Borie, F., Valentine, A., & Cornejo, P. (2019). Arbuscular mycorrhizal colonization promotes the tolerance to salt stress in lettuce plants through an efficient modification of ionic balance. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, *19*, 321–331. https://doi.org/10.1007/s42729-019-00032-z
68. Sarker, U., Islam, M.T., & Oba, S. (2019). Salinity Stress Accelerates Nutrients, Dietary Fiber, Minerals, Phytochemicals and Antioxidant Activity in *Amaranthus tricolor* Leaves. *PLoS One*, 13, e0206388. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206388
69. Singh, J., & Thakur, J.K. (2018). Photosynthesis and Abiotic Stress in Plants. In: Vats, S. (eds) *Biotic and Abiotic Stress Tolerance in Plants*. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-9029-5_2
70. Wagner, G.J. (1979). Content and Vacuole/Extravacuole Distribution of Neutral Sugars, Free Amino Acids, and Anthocyanin in Protoplasts. *Plant Physiology*, 64, 88–93. https://doi.org/10.1104/pp.64.1.88
71. Wang, Y.F., Wang, S.P., Cui, X.Y., Chen, Z.Z., Schnug, E., & Haneklau, S. (2003). Effects of sulphur supply on the morphology of shoots and roots of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Grass and Forage Science*, *58*, 160–167. https://doi.org/10.1046/j.1365-2494.2003.00366.x
72. Zhang, T., Hu, Y., Zhang, K., Tian, C., & Guo, J. (2018) Arbuscular mycorrhizal fungi improve plant growth of *Ricinus communis* by altering photosynthetic properties and increasing pigments under drought and salt stress. *Industrial Crops and Products*, *117*, 13–19. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.02.087